In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful













Méthodes d’étude en Histologie

Dr. ALLOUN

L'HISTOLOGIE

Définition:

- **Etude microscopique de la morphologie et de la composition des tissus biologiques.**
- **L'histologie se doit de répondre à de multiples questions:**
- -Comment s'associent les cellules pour former les tissus?
- -Comment les tissus sont-ils structurés et agencés dans les organes? (jonctions étanches, d'ancrage, de communication, etc.).
- -Comment vont-ils réagir aux différents traitements physico-chimiques?

Méthodes d' études

PLUSIEURS ETAPES IMPORTANTES

- Le prélèvement de l'échantillon.
- Les techniques de préparation du matériel obtenu:
  - fixation.
  - Inclusion.
  - Coupes.
  - Coloration.
  - Montage.
- Observation des images obtenues.

Le prélèvement de l’échantillon.

LE PRELEVEMENT

- Il doit être pratiqué le plus tôt possible après la mort, parfois sur le vivant *(biopsie).*
- Eviter de triturer ou de malaxer l'organe et le détacher avec un instrument bien tranchant.
- Découper des tranches peu épaisses en tenant compte de l'orientation générale de l'organe.

DIFFERENTS PRELEVEMENTS

- Le frottis

Prélèvement médical au moyen d'un écouvillon stérile, d'une petite brosse ou d'une petite spatule (par exemple au niveau du col de l'utérus). Permet de prélever des cellules.



Les ponctions de liquide (pleurale, ascitique, péricardique, ...).



Les biopsies

prélèvements de très petite taille d'un tissus.







L'Exérèse partielle ou complète

Ablation chirurgicale d'un organe ou partie, d'une lésion, d'un corps étranger (ex: tumeur).

Elle est réalisée en bloc opératoire ou pour une autopsie.





Les techniques de préparation du matériel obtenu.

La fixation des échantillons

BUT :

- *éviter la décomposition post mortem.*
- *éviter la digestion tissulaire par des enzymes ou bactéries.*
- *préserver l'architecture des tissus (avoir un tissu dans un état aussi proche de l'état initial).*

Conditions:

- *se fait le plus vite possible après le prélèvement pour éviter la dégradation tissulaire.*



Liquides de fixation:

MO: *formol* (pénètre rapidement et fixe lentement)

liquide de Bouin (formol + acide picrique pénètre lentement et fixe rapidement)

ME: *gltaraldéhyde* , *acide osmique*

Remarque:

la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer

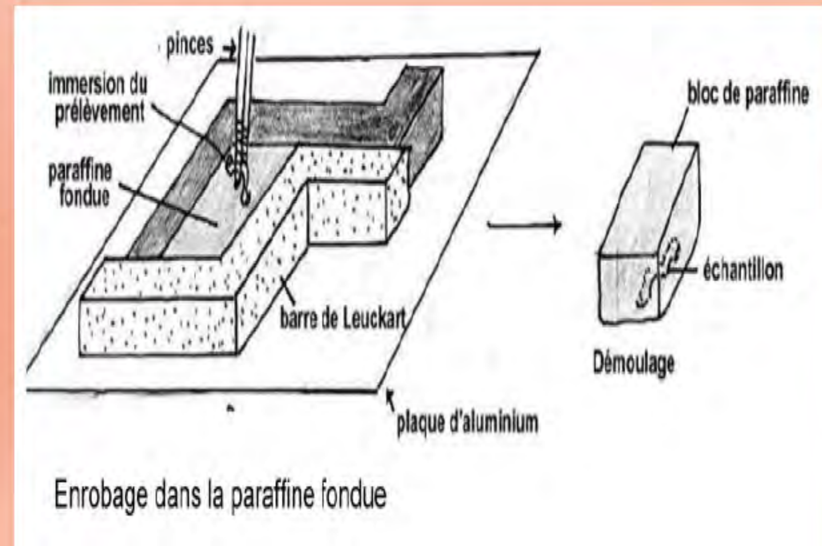
L' inclusion



L'inclusion a pour but la réalisation de coupes histologiques.
Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la ***paraffine***.
Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir :
-une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool, de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis à 100°).

puis est immergé dans des bains de **toluène(**(hydrocarbure) solvant miscible à la paraffine **(**élimine l'éthanol)

-Une fois totalement imprégné, le tissu est placé dans de la paraffine fondue (portée à 56/58°C)



Enrobage dans la paraffine fondue

L' inclusion

-**Puis la paraffine est placée dans de petits moules, à température ambiante, ce qui provoque son Durcissement.**

-on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.



les coupes

- **Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome permettant d'obtenir des :**
- tranches de section (**coupes histologiques) de 2 à 5 microns d'épaisseur. Les coupes sont**
- recueillies sur des lames de verre.







Autres appareils de microtomie

- *Ultra-microtome* (microscopie électronique):

obtention de coupes semi-fines (ép:0.5 à 1mm) à fines (ép:60-100µm)



coloration

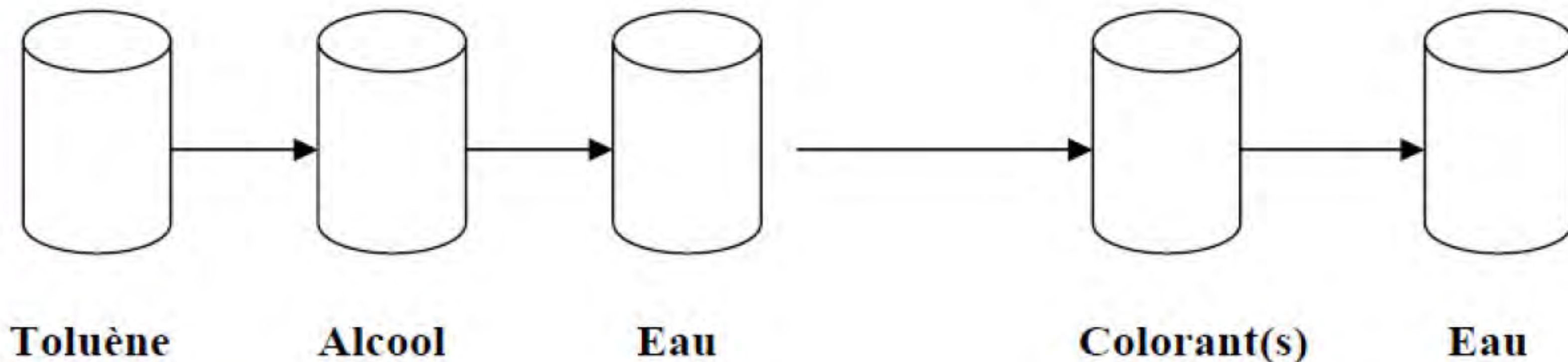
- *- La plupart des tissus sont transparents*

- *- Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour pouvoir reconnaître différents éléments du tissu.*



- Cependant, pour que l'on puisse utiliser une coloration, la paraffine doit être éliminée.
- On procède donc au déparaffinage, qui consiste à passer les lames dans des bains de toluène (afin de dissoudre la paraffine)
- On effectue ensuite une réhydratation : l'alcool se mélange avec l'eau et le toluène, on passe les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (de 100° à 70°, voire 50/40°).

- **Réhydratation & coloration**



Les colorants



- **La coloration de routine**

(coloration par l'hémateine et l'éosine) utilise deux colorants différents :

l'hématéine qui colore :

les noyaux en violet et

l'éosine

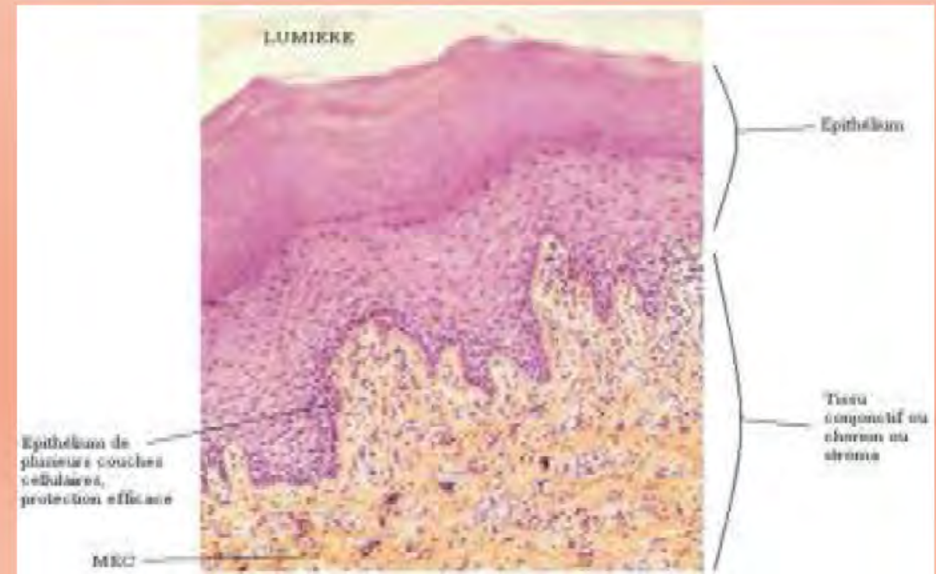
Les *cytoplasmes* en rose.

autre coloration utilisée est ***HES :***

hématéine / éosine / safran.

le safran colore

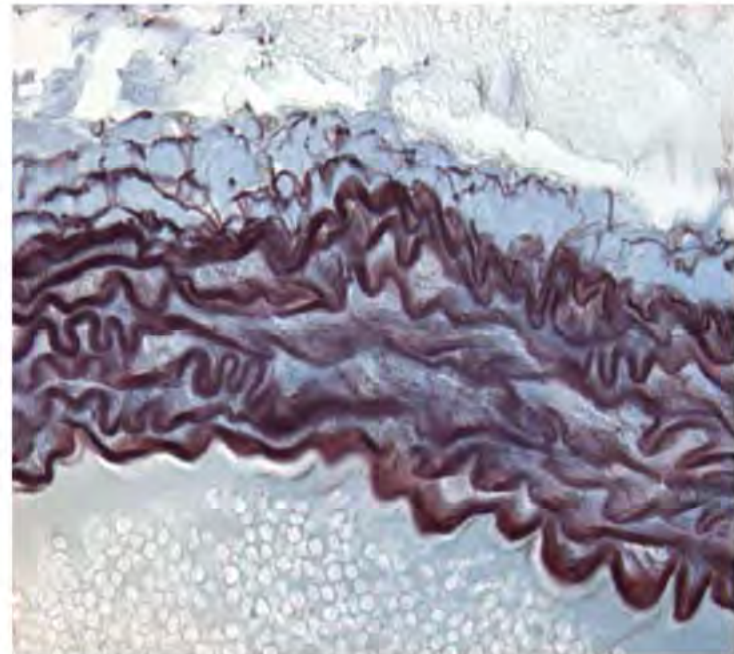
les fibres de collagène en jaune.



- ***Autres colorations spéciales (dites signalétiques) permettent de visualiser différentes structures ou composants des tissus***

  (par exemple, les fibres élastique

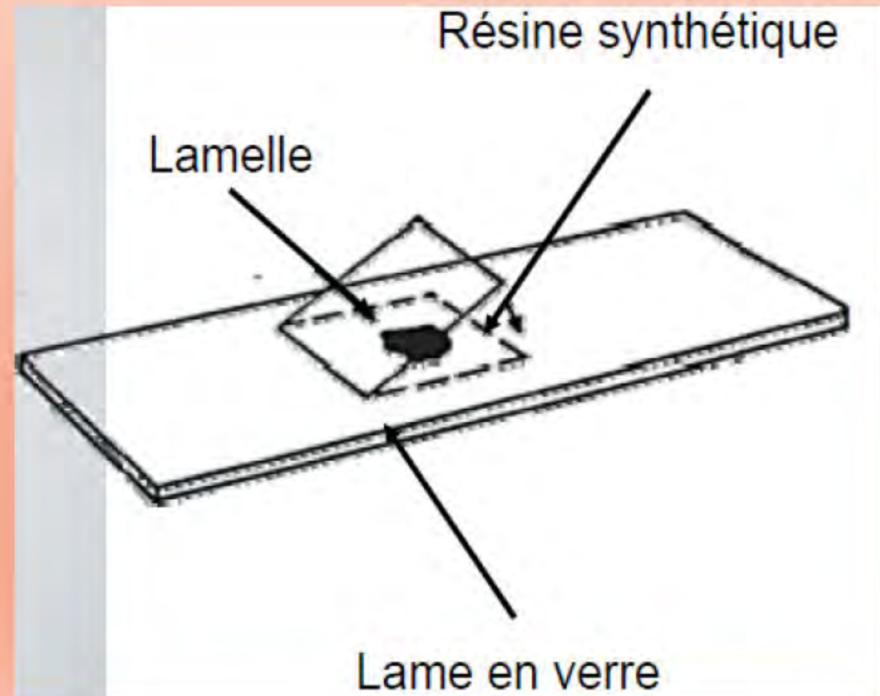
  Par ***l'orcéine***).



Coupe à travers une paroi artérielle colorée par l'orcéine

Le montage

- les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle.
- Avant de les monter sur lame, ils subissent une dernière déshydratation (bains d'alcool de degré croissant).
- On dispose alors d'une « préparation microscopique » (appelée « lame ») prête à être observée au microscope optique (MO).



Observation des images obtenues.

L' OBSERVATION

Se fait grâce au microscope:

- *Le microscope optique (MO; ou microscope photonique);*

le plus courant utilise la lumière visible.

- La lumière peut être remplacée par une autre source lumineuse :

- rayons ultraviolets (microscope à fluorescence):

  cristaux

- faisceau d'électrons (microscope électronique à transmission ou à balayage; ME)

- source laser (microscope confocal à balayage laser).



Le microscope électronique.



Pouvoir séparateur

- Le pouvoir séparateur du microscope optique est de l'ordre de 0,2μ.
- Le pouvoir séparateur du microscope électronique de 0,2nm.
- Le pouvoir séparateur de l'œil humain est de l'ordre de 0,2mm.

merci